

Focal adhesion kinase 발현 조절을 통한 연골육종 세포주의 침습성 조절

김윤희 · 박희봉* · 신규호 · 한수봉 · 이진우

연세대학교 의과대학 정형외과학교실, 아주대학교 의과대학 외과학교실*

목 적 : Focal adhesion kinase (FAK) 발현 조절이 연골육종 세포주의 부착과 침습에 미치는 영향을 보고자 하였다.

대상 및 방법 : FAK의 C-말단 부위(FAK-CD)를 포함하고 있는 아데노바이러스를 사람의 연골육종 세포주인 JJ012와 105KC에 형질전환 후, FAK와 FAK-CD의 발현 및 FAK의 인산화를 관찰하였다. 연골세포 및 연골육종 세포주를 배양하여 integrin- β 1 항체와 합성 펩타이드를 반응시킨 후 제 2형 교원질에 대한 세포 부착을 살펴보고, 세포 침습은 wound healing assay와 Boyden chamber assay로 측정하였다.

결 과 : 연골육종세포는 연골세포에 비해 FAK가 과발현 되어 있으며, 제 2형 교원질에 의미있게 부착되었고, integrin- β 1 항체와 합성 RGD 펩타이드에 의해 세포 부착이 억제되었다. FAK-CD의 형질전환은 FAK 발현의 변화 없이 FAK 인산화와 JJ012의 제 2형 교원질에 대한 부착을 저해시켰고, JJ012 (75.5%)와 105KC (79.9%)의 침습을 모두 억제하였다.

결 론 : 연골육종세포의 부착은 integrin- β 1을 매개로 하여 이루어지며, FAK 발현 조절에 의해 종양 세포의 부착과 침습을 제어할 수 있을 것으로 기대된다.

색인 단어 : 연골육종 세포주, 세포 부착, 세포 침습, Focal adhesion kinase, Integrin- β 1, FAK-CD

The Control of Tumor Cell Invasiveness in Chondrosarcoma Cell Lines by Modifying Focal Adhesion Kinase Expression

Yun Hee Kim, M.S., Hee Boong Park, M.D.*, Kyu Ho Shin, M.D., Soo Bong Hahn, M.D., and Jin Woo Lee, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul; Department of Surgery*, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Purpose : We propose that cell attachment and invasion can be regulated by the modulation of FAK expression in chondrosarcoma cell lines.

Materials and Methods : The C-terminal domain of FAK (FAK-CD) was transfected by recombinant adenovirus infection in chondrosarcoma cell lines, JJ012 and 105KC. The expression of FAK, FAK-CD and tyrosine phosphorylation were checked. Chondrocytes and chondrosarcoma cells were used in cell attachment tests by blocking or not blocking integrin- β 1 antibodies and synthetic peptides on type II collagen. To evaluate the effect of cell invasiveness, a wound healing assay and a Boyden chamber assay were done after FAK-CD transfection.

Results : We observed higher FAK expression in the chondrosarcoma cells than in chondrocytes. The level of attachment to type II collagen was significantly inhibited by blocking with the antibody of integrin- β 1 and synthetic RGD peptides. Also, the adenovirus mediated transfection of FAK-CD resulted in the inhibition of the phosphorylation of FAK and significant inhibition of cell attachment in only JJ012, without changing FAK expression. Moreover, migration after transfection with FAK-CD was reduced by up to 79.9% for JJ012 and 75.5% for 105KC.

Conclusion : Attachment of chondrosarcoma cells could be mediated through integrin- β 1. We conclude that modified FAK expression contributes to the suppression of tumor cell attachment and invasion.

Key Words : Chondrosarcoma cell line, cell attachment, cell invasion, focal adhesion kinase, integrin- β 1, FAK-CD

서 론

종양 세포는 최초 발생부위에서 다른 장기로 이동하여 성장하

는 전이과정을 거친다. 전이는 원발 병소로부터 종양세포가 타 장기에 세포가 부착된 후 주위 세포의 기질을 파괴하면서 이동하는 세가지 과정을 거치게 된다^{14,17-19}. 세포의 부착은 세포 표

통신저자 : 이진우
서울시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 정형외과학교실
TEL : 02-361-5640 · FAX : 02-363-1139
E-mail : ljwos@yumc.yonsei.ac.kr

*본 논문은 2001년도 연세대학교 교수연구비 지원에 의하여 연구되었음 (2001-01).

Address reprint requests to
Jin Woo Lee, M.D.
Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine
134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea
Tel : +82-2-361-5640, Fax : +82-2-363-1139
E-mail : ljwos@yumc.yonsei.ac.kr

면의 단백질에 의하여 조절되는데 이 중 대표적인 것이 integrin 이다. 그리고, 기질의 파괴는 matrix metalloproteinases (MMP) 효소와 이를 억제하는 tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)의 균형에 의해 이루어지며, 세포의 이동은 세포내 골격 구조인 actin filament의 작용에 의해 이루어진다고 할 수 있다. 세포의 부착을 매개하는 integrin은 세포의 성장, 사멸, 분화, 형태 및 세포의 이동 등의 기본적인 생물학적 과정 뿐 아니라 종양의 성장 및 전이의 조절에 관계한다고 한다⁶⁾. Integrin의 다양한 기능은 세포막을 통한 생화학적 신호 전달에 의해 이루어지는데 즉 integrin $\beta 1$ subunit과 focal adhesion kinase (FAK)의 N-terminal domain이 물리적으로 연결되어 있으며, FAK는 Src계 kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, tensin, paxillin 등 수많은 단백질과 결합함으로써 신호 전달 과정의 중심적인 역할을 한다^{5,10,20)}. 1993년 Weiner 등²²⁾은 사람의 연부 조직 종양중에서 침습적인 종양에서 FAK가 과발현되어 있다고 하여 FAK가 종양의 침습에 관여함을 보고하였다. 또한 1998년 Xu 등²⁵⁾은 인위적으로 FAK의 발현을 억제 시켰을 경우 종양 세포의 부착이 상실되며 종양 세포의 사멸이 유도되었음을 밝혔으며, Cance 등²⁾은 FAK의 과발현이 종양의 침습성과 상관관계가 있다고 보고하였다. 따라서 본 연구는 연골육종 세포주에서 FAK의 발현 조절이 암세포의 침습성과 직접적인 관련이 있다는 것을 증명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포의 배양

정상 대조군으로 관절 연골 세포를 사용하였으며, 연골세포의 분리는 소의 슬관절을 구입하여 관절 연골을 채취한 다음 효소 처리하였으며, 연골육종 세포주로는 연골세포와 유사한 발현형을 보이는 JJ012와 105KC (Gifts from Dr. Block, Chicago, IL, USA)를 이용하였다(Table 1). 모든 세포는 10% 우태혈청이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/F-12 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 단층 배양하였다.

2. 세포외기질에 대한 연골세포의 부착능 측정

세포의 부착 실험은 1 μ g/mL의 제 2형 교원질(Chondrex, WA, USA)이 도포된 96-well immunoplate (Maxi Sorp, Nunc, Denmark)를 사용하였고, Bovine serum albumin (BSA)으로 도포된 immunoplate는 비특이적 결합에 대한 음성 대조군으로 사용하였다. 연골세포의 부착에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 integrin- $\beta 1$ (1:100, 4B4 clone, Coulter, CA, USA)과 anchorin CII 항체(Gift from Dr. Mollenhauer, Chicago, IL, USA) 및 합성 RGD 펩타이드(Integra, Temec-

Table 1. Biochemical and phenotypic analysis of the chondrosarcoma cell lines

Biochemical analysis	JJ012	105KC
Immunostaining: Type II collagen	No type II collagen	Extensive type II collagen
Keratan sulfate	No Keratan sulfate	13% substitution
Cell growth and doubling time	Rapid: 0.5-1 day	Slow: 6-7 days
Relative aggrecan mRNA	.89 \times 105KC	1
Collagen II/collagen I ratio	.80	1.07
Level of differentiation	Poorly	Highly

ula, CA, USA)를 사용하였다. 또한 항체의 음성 대조군으로는 non-specific IgG와 non-cyclic RGD 펩타이드를 사용하였다. 단층배양한 연골세포 및 연골육종 세포는 0.5% BSA, 20 mM HEPES (pH 7.4)가 포함된 DMEM에 세포수가 1×10^6 이 되도록 희석하여 30분간 방치하였다. 항체 integrin- $\beta 1$ 과 anchorin CII 및 합성 RGD 펩타이드는 위와 동일한 배지에 희석하여 세포 희석 용액과 혼합한 후, 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 세포 부착은 37°C, 1시간 동안 시켰으며, 부착된 세포는 hexosaminidase assay를¹³⁾ 통해 정량화하였다. 측정된 수치에서 BSA에 부착된 세포의 수를 뺀으로써 표준화하였으며, 모든 실험은 세 번 반복하여 평균값을 측정하였다.

3. FAK-CD를 포함한 아데노바이러스 벡터의 재조합 및 형질전환

재조합 아데노바이러스 벡터의 제작은 인간의 FAK 유전자의 C-말단부위의 360개의 아미노산에 대한 cDNA를 합성한 후, 외부 표식 인자로서 cDNA의 N-말단에 hemagglutinin (HA) 서열을 연결하여 pCRII vector (Invitrogen, CA, USA)에 클로닝 하였다(pCRII-FAK-CD). 재조합 아데노바이러스로는 pACCMV.PLPASR (+) 서플벡터를 사용하였으며 pCRII-FAK-CD와 함께 Kpn I 제한효소를 처리하여 클로닝하여 제작하였다. 바이러스의 역가는 플라그 형성 활성도(plaque forming activity)를 통해 측정하였고, 음성대조군으로는 β -galactosidase를 발현하는 Lac Z 유전자를 포함한 아데노바이러스 벡터를 이용하였다. 형질전환은 100 mm 세포 배양 용기에 1.5×10^6 의 세포를 24시간 배양하고, 새 배지로 교체 후, 바이러스 벡터를 첨가하여 12시간 배양함으로써 유도되었다.

4. Western blotting과 Immunoprecipitation

세포의 전체 단백질은 NP-40 lysis buffer [1% NP-40, 20 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM Na₂VO₄, 10 μ g/mL protease inhibitor (aprotinin and leupeptin)]로 분리한 후, 50 μ g의 세포 추출액을 사용하여 전기영동을 실시하였다. 단백질은 완충용액에서 nitrocellulose mem-

brane으로 이동시킨 후, 단일 항체 HA (12CA5, Boehringer Mannheim, Germany)와 integrin $\alpha 2$ 와 $\alpha 5$ (Chemicon, CA, USA)와 반응시켰다. FAK의 인산화는 250 μ g의 세포 추출액을 1 μ g의 FAK 항체 또는 10 μ g의 HA 항체와 반응시켜 침전 분리한 후, 인산화를 인식하는 항체(4G10, Upstate Biotech, NY, USA) 및 FAK 항체(C20, Santa Cruz, CA, USA)로 western blotting을 통해 확인하였다. 모든 western blotting의 발색은 ECL detection system (Amersham, NJ, USA)을 이용하였다.

5. Wound healing assay

24 well plate에 제 1형 교원질(10 μ g/mL) 및 제 2형 교원질(1 μ g/mL)을 도포하고, 비특이적 세포 부착을 억제하기 위해 BSA로 37°C에서 1시간 도포하여 사용하였다. FAK-CD를 형질전환시킨 두 연골육종 세포주(JJ012&105KC)를 plate에 부착시키고, scratching한 시간을 기준(0시간)으로 시간별 wound healing 정도를 거리의 간격으로서 측정하여 평균값으로 나타내었다.

6. Quantitative cell migration assay

정량적인 세포 이동을 측정하기 위해 제 1형 교원질이 도포되어 있는 Boyden chamber assay (Chemicon, CA, USA)를 실시하였고, 음성대조군으로는 BSA가 도포된 chamber를 사용하였다. 세포는 FAK-CD를 형질전환 후 혈청이 결여된 배지에서 15시간 동안 배양하였다. 15시간 후 부착된 세포를 떼어 5% BSA가 포함된 DMEM배지로 세포수가 5×10^5 /mL이 되도록 희석하였다. 각 chamber에 500 μ L의 세포희석 용액을 떨어뜨린 후 37°C에서 15시간 배양하였다. 제 1형 교원질 및 BSA로 이동된 세포만을 측정하기 위해서 표면에 부착된 세포는 swab으로 깨끗이 제거하고 세포염색용액으로 실온에서 30분간 염색

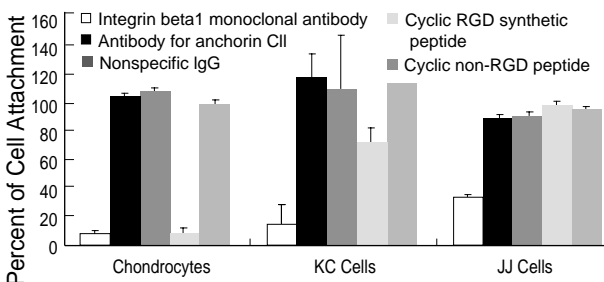


Fig. 1. Effects of collagen receptor blocking on chondrosarcoma cell lines (JJ and KC cells) and chondrocyte attachment to type II collagen. Immunoplates were coated with collagen type II (1 μ g/mL) and blocked for nonspecific binding with 1% BSA. Attachment assays were performed in triplicate and each experiment was repeated on at least three occasions. The numbers represent the mean adhesion of three wells \pm SD from three experiments.

하였다. PBS로 3회 세척한 후 300 μ L의 extraction buffer에서 5분간 흔들어 염색을 용출시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

1. 제 2형 교원질에 대한 연골세포의 부착에서 integrin, anchoring CII, 합성 RGD 펩타이드가 미치는 영향

7일째 단층 배양하여 사용된 연골세포는 제 2형 교원질에 의미있게 부착되었으며, BSA로 도포된 표면에는 부착되지 않았다. BSA로 표면 처리된 경우와 비교할 때, 연골세포, JJ012 및 105KC 모두 제 2형 교원질에 의미있게 부착되었다. 이러한 세포 부착은 integrin- $\beta 1$ 항체에 의해 연골세포(95%), JJ012 (68%) 및 105KC (87%)의 모든 세포에서 억제되었다(Fig. 1). 또한, 합성 RGD 펩타이드는 연골세포(94%)와 105KC (29%)의 부착을 억제시켰으나, JJ012의 부착은 억제하지 않음을 관찰할 수 있었다.

2. Western blotting과 Immunoprecipitation

연골세포에 비해 두 연골육종 세포주에서 FAK가 과발현되고 있음을 보였고, 특히 JJ012에서의 발현이 가장 높은 것으로 관찰되었고, 이러한 FAK 발현의 차이는 세포의 분화 정도와 관련이 있었다(Fig. 2). 아테노마비리스를 이용한 FAK-CD의 형질전환 후 FAK-CD의 발현을 확인하였으며, FAK의 발현에

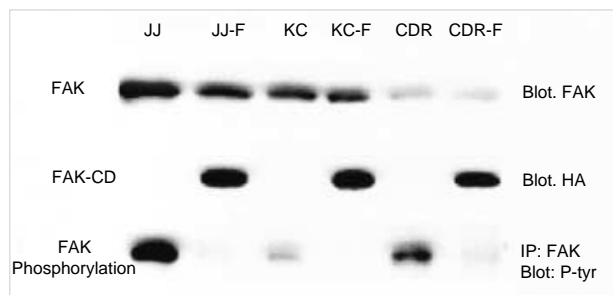


Fig. 2. FAK expression and phosphorylation after transfection (JJ-F, KC-F, & CDR-F) by Western blot and immunoprecipitation analysis. Expression of FAK-CD after transfection was detected using anti-HA monoclonal antibody. Analysis of tyrosine phosphorylation of FAK was accomplished by the immunoprecipitation of FAK followed by Western blot analysis with anti-phosphotyrosine antibody. For immunoprecipitation, 250 μ g of cell lysate was incubated with 1 μ g of anti-FAK polyclonal antibody or 10 μ g of anti-HA monoclonal antibody in the presence of protein A/G-agarose. The precipitated proteins were analyzed by Western blot using anti-phosphotyrosine monoclonal antibody or anti-FAK antibody. A total of 50 μ g of cell lysate was analyzed for FAK expression using anti-FAK polyclonal antibody.

는 아무런 영향을 주지 않았으나 FAK의 인산화를 현저히 억제시켰다(Fig. 2). 따라서 FAK-CD를 통해 효과적으로 FAK의 인산화를 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

3. FAK-CD의 형질전환이 세포 부착에 미치는 영향

아데노바이러스를 이용하여 FAK-CD의 형질전환 후, 세포 부착 실험을 실시하였으며, integrin의 관여 여부를 알기 위해 단일 항체 integrin- $\beta 1$ 을 사용하였고, 형질전환의 대조군으로는

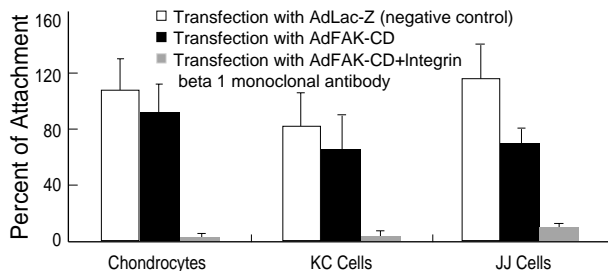


Fig. 3. Chondrosarcoma cells (JJ and KC cells) and chondrocyte attachment to type II collagen after transfection with FAK-CD. Transfection with Lac-Z gene was used as a control. Cells (100,000/well) were incubated with integrin $\beta 1$ antibody for 1 h at 4°C and then allowed to adhere for 1 h at 37°C. Nonadherent cells were removed by washing, and adhesion was determined by analyzing lysosomal hexoaminidase. Attachment assays were performed in triplicate and each experiment was repeated on at least three occasions. The numbers represent the mean adhesion of three wells \pm SD from three experiments.

동일한 아데노바이러스에 재조합된 Lac Z 유전자를 사용하였다(Fig. 3). Integrin- $\beta 1$ 을 처리한 경우, 두 연골육종 세포주 모두 95%의 세포 부착의 억제를 보였고, 처리하지 않은 경우에는 JJ012만이 유의있게 억제되었다. 이러한 결과는 JJ012의 제2형 교원질에 대한 부착이 FAK-CD에 의한 FAK인산화의 억제로 저해될 수 있으며, 이러한 억제 효과는 integrin- $\beta 1$ 항체에 의해 더욱 증가함을 의미하였다.

4. Wound healing assay

FAK-CD를 형질전환 시킨 경우 JJ012는 9시간째부터 대조군과 차이를 보였고, 105KC는 18시간째에 유의있게 세포의 이동이 감소하였다. 또한, JJ012는 30시간째, 105KC는 15시간째에서 대조군과의 세포 이동에 가장 큰 차이를 보였다. 두 연골육종 세포주는 교원질의 종류에 따른 세포 이동에 차이를 보이지 않았다(Fig. 4).

5. FAK-CD의 세포 이동에 미치는 영향

5% BSA가 포함된 배지에서 15시간 동안 세포이동을 시킨 결과, 세포의 이동은 JJ012에서 가장 높았으며, 두 연골육종 세포주가 연골세포에 비해 모두 증가되었다. FAK-CD의 형질전환은 두 연골육종 세포주의 이동을 모두 유의있게 억제시켰다. JJ012의 79.9%, 105KC의 75.5%가 세포이동이 억제된 반면, FAK-CD에 의한 연골세포의 이동은 억제되지 않았다(Fig. 5).

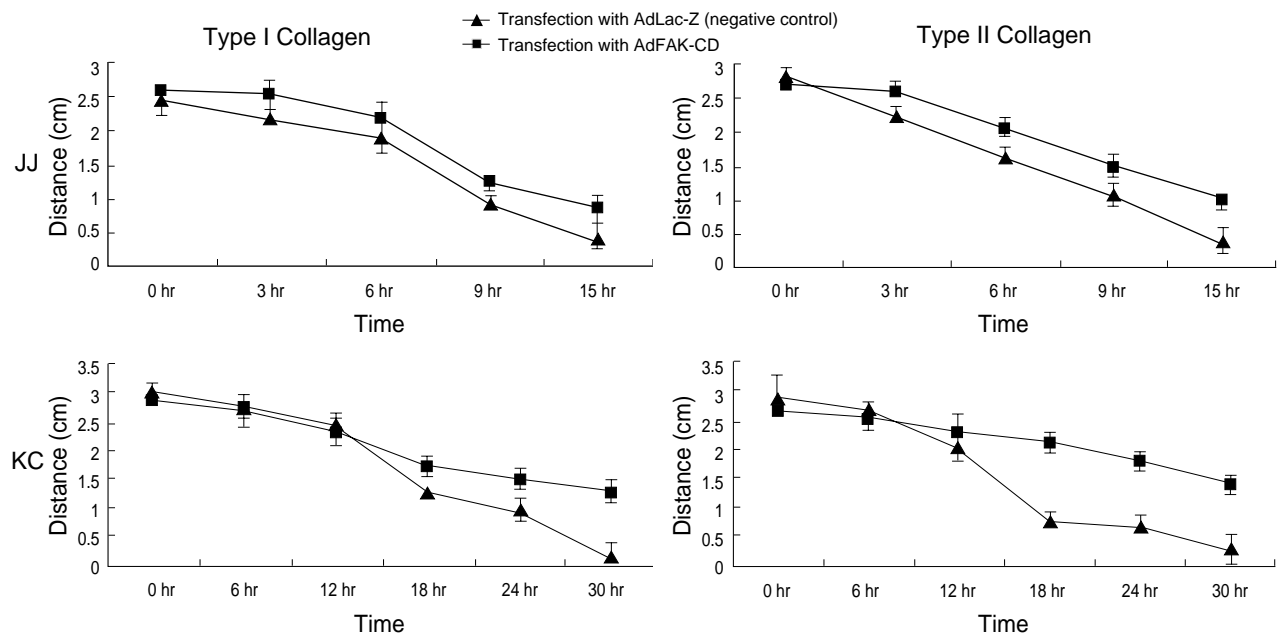


Fig. 4. Exponentially growing cells were plated on collagen type I (10 μ g/mL) coated 24 well culture plates in complete growth media after transfecting with FAK-CD. After 8 hours, the monolayer of transfected cells were wounded by scratching with a pipet tip, washed with PBS, photographed (0 hour point) and interval distances were measured.

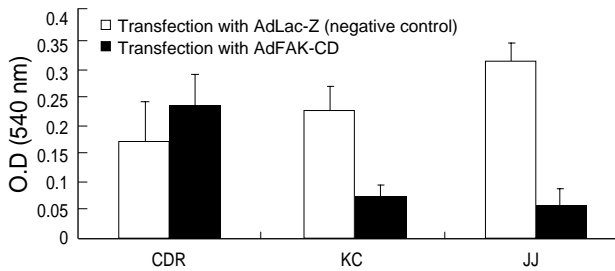


Fig. 5. Quantitative cell migration assay. Transfected cells were inoculated on QCM™-Collagen I plates at a density of 2.5×10^5 cell/well and maintained in serum-free DMEM containing 5% BSA. After 15 h incubation at 37°C, media and cells on the perimeter of the chamber were removed thoroughly with swabs. Staining was carried out for 30 min at room temperature. After cell staining, the cell stain was eluted with 300 μ L of extraction buffer for 10 min. Extraction buffer solubilized from stained migratory cells was transferred into a microtiter plate, and absorbance was measured at 540 nm. Quantitative cell migration assays were performed in triplicate wells and each experiment was repeated on at least three occasions.

고찰

세포의 운동성은 성장인자, 사이토카인, G 단백질, 암 유발 유전자, 암 억제 유전자 등에 의해 조절되거나 조작될 수 있다^{11,12,15,16}). 그러나, 세포 이동에 관련된 많은 물질들이 밝혀졌음에도 불구하고, 아직까지 세포가 이동하는 데 있어서 이동의 방향성(directionality)과 이동 속도가 세포내에서 어떻게 조절되는지에 대해서는 거의 밝혀지지 않았다. 본 연구는 중앙 세포 부착 및 이동에 관련된 인자로서 FAK조절에 초점을 두었다. FAK는 세포 부착에 있어서 integrin을 통한 세포 신호 전달에 주 역할을 하는 것으로 알려져 있으며²¹), integrin은 focal adhesion의 형성과 함께 FAK와 결합하고, 세포와기질의 리간드와의 결합으로 활성화됨으로써 FAK의 tyrosine 아미노산의 인산화를 증가시킨다^{1,9}). 인산화 된 FAK는 세포의 신호 전달 체계를 통해 세포 이동 뿐 아니라 세포 성장 및 사멸에 관여하게 된다. 이러한 사실은 중앙 세포가 최초 발생부위에서 다른 장기로 이동하여 성장하는 전이과정에 매우 중요한 의미를 부여해 준다고 할 수 있다. 전이가 이루어지기 위해서는 세포가 부착된 후 이동하는 과정이 필요하며, FAK는 세포의 부착과 이동에 모두 관여하는 물질로 보고됨으로써, FAK의 조작을 통한 세포의 전이를 억제할 수 있는 효과적인 물질로 기대되기 때문이다. 따라서, 본 연구는 FAK가 과발현 된 연골육종 세포주를 사용하여 FAK-CD의 형질전환이 FAK 발현의 변화와 세포의 부착 및 이동에 미치는 영향을 살펴 보았다.

세포 부착 실험에서, integrin- $\beta 1$ 항체에 의해 연골세포와 연골육종 세포 모두에서 세포 부착이 억제되었다. 이러한 결과는 연골세포 뿐만 아니라, 연골 육종세포의 제 2형 교원질에 대한 부착이 integrin- $\beta 1$ 을 매개로 이루어지는 것을 알 수 있었다.

Cardarelli 등³⁾에 의하면 연골세포와 세포의 기질간의 상호 작용은 많은 부분이 integrin- $\beta 1$ 을 매개로 함을 보고하였고, 이는 integrin- $\beta 1$ 과 세포의 기질과의 결합이 세포내 세포골격 단백질과 신호전달 단백질을 활성화함으로써 연골기질 단백질인 제 2형 교원질에 대한 세포 부착에 관여할 것으로 사료된다. Integrin과 세포의 기질간의 상호작용은 세포 내 특정 신호 전달 물질을 활성화함으로써 세포의 외부신호에 대한 반응을 조절하는 것으로 밝혀지고 있으나 연골세포에서의 연구는 아직 없는 실정이다. 본 실험에서는 integrin- $\beta 1$ 뿐만 아니라 integrin의 세포외 기질을 구성하는 단백질과 결합하는 RGD 펩타이드에 대한 세포 부착을 측정하였다. 즉, 연골세포의 제 2형 교원질에 대한 부착이 integrin 중에서도 RGD부위를 매개로 하여 이루어지는 것을 살펴 보았으며, 합성 RGD 펩타이드로의 억제는 연골세포에서 integrin- $\beta 1$ 과 동일한 세포부착을 억제하였으나, 연골육종 세포는 105KC만이 유의있게 억제되었고, integrin- $\beta 1$ 항체에 의한 억제보다 낮은 효과를 보였다. 따라서, 연골세포의 제 2형 교원질에 대한 부착은 대부분 integrin- $\beta 1$ 의 RGD부위를 매개로 이루어지나, 연골육종 세포는 RGD에 의한 세포 부착에 큰 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 이러한 차이는 정상세포가 중앙세포로 형질전환되는 과정 중에서 나타나는 현상 중의 하나인 세포의 형태 변화와 함께 세포의 기질에 대한 부착의 변화를 미루어 볼 때, FAK가 과발현된 연골육종 세포의 제 2형 교원질에 대한 부착은 integrin의 RGD부위를 매개로 하지 않으며, FAK 발현과 관계하는 다른 기전이 있을 것으로 사료된다. 이는 105KC보다 FAK가 과발현되어 있는 JJ012에서 integrin- $\beta 1$ 항체와 RGD 펩타이드에 의한 부착의 억제가 낮게 나타난 결과로 추측될 수 있었다.

FAK-CD의 형질전환은 FAK의 발현에는 아무런 영향이 없었으나, FAK의 인산화를 현저히 억제시켰다. FAK-CD의 형질전환은 JJ012에서만 의미있게 세포 부착을 억제하였고, 형질전환 후 integrin- $\beta 1$ 항체와 반응시켰을 때 모든 세포에서 95%의 세포부착을 억제하였다. 따라서, 연골세포의 제 2형 교원질에 대한 부착은 FAK-CD의 형질전환에 의해 의미있게 억제되지 않으나, 연골육종 세포 중 FAK발현이 높을수록 FAK-CD에 의한 세포 부착에 조절 받으며, 모든 연골세포에서 세포와 세포의 기질과의 부착에 integrin- $\beta 1$ 이 중요한 역할을 한다는 것을 의미하였다. Boyden chamber를 이용한 세포의 이동은 FAK-CD의 형질전환 후 JJ012 (79.9%)와 105KC (75.5%) 모두 감소되었고, 동일한 결과로 wound healing assay를 이용한 실험에서 세포의 기질에 부착한 후 세포의 이차원적 이동에서 또한 FAK-CD에 의해 연골육종 세포의 이동이 모두 감소되었다. 이러한 결과는 FAK-CD에 의한 FAK의 활성을 변화시킴으로써 중앙 세포의 이동에 직접적으로 관여하는 것으로 사료되며, *in vivo*에서 침습적 성질이 있는 중앙 세포가 boyden chamber의 이동 증가와 상관 관계가 있다는 보고를 미루어 볼 때²⁴), FAK가 과발현된 연골 육종세포는 세포의 기질에 부착하

여 이동하는 성질이 증가함으로써, 국소적인 침습이나 전이를 야기시키는 것으로 사료된다. 또한 연골세포에 비해 FAK가 과발현되어 있는 연골육종 세포에서 FAK의 발현이 세포 이동 및 세포의 분화 정도와 관련이 있음을 관찰할 수 있었으며 이는 악성 종양 세포에서 FAK의 과발현이 세포의 기질로의 세포부착과 이동의 증가에 중요한 역할을 할 것으로 추측되어진다.

FAK의 C-terminal에 의한 세포 이동의 억제제는 다른 종양 세포와 같이 연골육종 세포에서도 관찰할 수 있었으며, 종양 세포의 전이를 억제하기 위해서는 FAK와 결합하여 세포내 다양한 기능을 조절하는 물질을 더 살펴 볼 필요성이 있을 것으로 사료된다. 그러한 대표적인 물질로 종양 세포에서 발현되는 종양억제유전자인 PTEN (Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome Ten)을 들 수 있다^{4,7,23}. PTEN은 세포의 이동과 침습 및 성장을 억제하는 역할을 하며, 대부분의 암에서 변이되어 발견되고 있으며 FAK와 직접적으로 결합하여 FAK뿐만 아니라, p130 Crk-associated substrate (p130^{Cas})의 인산화를 억제시킨다. 따라서, PTEN은 FAK와 p130^{Cas}와 서로 상반된 기능을 하며 FAK가 과발현된 세포는 FAK의 인산화가 재증가 하는 것으로 보아 세포 이동과 침습에 대한 PTEN의 역할을 억제할 것으로 보고되었다⁸. 또한 FAK는 p130^{Cas}의 활성화와 함께 integrin을 매개로 한 세포 이동을 더욱 증진시키기 때문에 종양 세포의 침습 기전을 파악하기 위해서는 FAK와 함께 PTEN, p130^{Cas}의 상관관계를 밝혀야 할 것으로 사료된다. 이러한 연구의 일환으로 본 연구를 통해 FAK의 발현과 연골육종 세포의 부착, 이동 및 침습과 상관 관계가 있음을 알 수 있었으며, 특히 FAK-CD에 의한 FAK의 조작은 연골육종 세포 이동을 억제 할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서, FAK의 조작을 통해 연골육종 뿐만 아니라, FAK가 과발현된 많은 종양의 전이를 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

결론

본 연구를 통해 연골육종 세포주는 연골세포에 비해 FAK가 과발현되어 있으며, FAK의 발현 정도는 세포의 분화와 상관 관계가 있음을 알 수 있었다. 제 2형 교원질에 대한 세포 부착은 연골세포와 FAK가 과발현된 연골육종세포 모두 integrin- β 1을 통해 이루어지며, integrin- β 1에 의한 세포 부착은 정상 연골세포와는 달리 연골육종 세포에서는 RGD부위를 매개로 하지 않음을 알 수 있었다. 이러한 FAK의 활성화는 외부적으로 유도된 FAK의 C-말단 부위의 형질전환으로써 유의있게 억제되었고, 이로 인해 세포의 부착과 세포의 침습이 저해됨을 관찰하였으며, FAK 발현이 많은 세포일수록 FAK-CD에 의한 세포 부착과 이동에 조절 받음을 보였다. 따라서, 본 연구는 FAK의 발현의 조작을 통해 연골육종 세포뿐만 아니라, FAK가 과발현된 종양 세포의 침습 및 전이를 억제시킬 수 있는 새로운 시도로 기대된다.

참고문헌

1. Burridge K, Turner CE and Romer LH: Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol*, 119: 893-903, 1992.
2. Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, et al: Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res*, 6: 2417-2423, 2000.
3. Cardarelli PM, Yamagata S, Taguchi I, Gorcsan F, Chiang SL, and Lobl T: The collagen receptor alpha 2 beta 1, from MG-63 and HT1080 cells, interacts with a cyclic RGD peptide. *J Biol Chem*, 267: 23159-23164, 1992.
4. Cheney IW, Johnson DE, Vaillancourt MT, et al: Suppression of tumorigenicity of glioblastoma cells by adenovirus-mediated MMAC1/PTEN gene transfer. *Cancer Res*, 58: 2331-2334, 1998.
5. Clark EA and Brugge JS: Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, 268: 233-239, 1995.
6. Dedhar S and Hannigan GE: Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol*, 8: 657-669, 1996.
7. Furnari FB, Lin H, Huang HS and Cavenee WK: Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 12479-12484, 1997.
8. Gu J, Tamura M, Pankov R, et al: Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol*, 146: 389-403, 1999.
9. Guan JL, Trevithick JE and Hynes RO: Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *Cell Regul*, 2: 951-964, 1991.
10. Hanks SK and Polte TR: Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays*, 19: 137-145, 1997.
11. Huttenlocher A, Sandborg RR and Horwitz AF: Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 7: 697-706, 1995.
12. Hynes RO and Lander AD: Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell*, 68: 303-322, 1992.
13. Landegren U: Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immunol Methods*, 67: 379-388, 1984.
14. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG and Steeg PS: Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements. *Cancer Invest*, 9: 543-551, 1991.
15. Nobes CD and Hall A: Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81: 53-62, 1995.

16. **Oliver T, Lee J and Jacobson K:** Forces exerted by locomoting cells. *Semin Cell Biol*, 5: 139-147, 1994.
17. **Ruoslahti E:** Integrins. *J Clin Invest*, 87: 1-5, 1991.
18. **Ruoslahti E:** Integrin signaling and matrix assembly. *Tumour Biol*, 17: 117-124, 1996a.
19. **Ruoslahti E:** RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12: 697-715, 1996b.
20. **Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB and Parsons JT:** pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 5192-5196, 1992.
21. **Ueki K, Mimura T, Nakamoto T, et al:** Integrin-mediated signal transduction in cells lacking focal adhesion kinase p125FAK. *FEBS Lett*, 432: 197-201, 1998.
22. **Weiner TM, Liu ET, Craven RJ and Cance WG:** Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet*, 342: 1024-1025, 1993.
23. **Whang YE, Wu X, Suzuki H, et al:** Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 5246-5250, 1998.
24. **Woodhouse EC, Chuaqui RF and Liotta LA:** General mechanisms of metastasis. *Cancer*, 80: 1529-1537, 1997.
25. **Xu LH, Yang X, Craven RJ and Cance WG:** The COOH-terminal domain of the focal adhesion kinase induces loss of adhesion and cell death in human tumor cells. *Cell Growth Differ*, 9: 999-1005, 1998.